

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP 99/05221

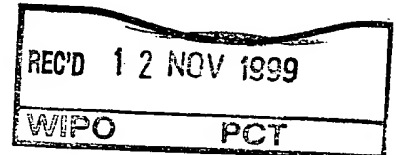
24.09.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年11月19日



出願番号
Application Number:

平成10年特許願第329832号

出願人
Applicant(s):

日本たばこ産業株式会社

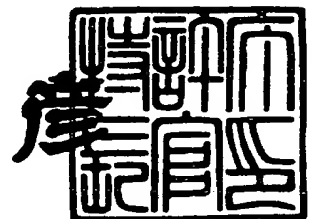
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3073525

【書類名】 特許願

【整理番号】 98558

【提出日】 平成10年11月19日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 核酸断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた構造遺伝子の発現促進方法

【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 日本たばこ産業株式会社遺伝育種研究所内

【氏名】 植木 潤

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代表者】 水野 勝

【代理人】

【識別番号】 100088546

【弁理士】

【氏名又は名称】 谷川 英次郎

【電話番号】 03(3238)9182

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053235

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた構造遺伝子の発現促進方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する核酸断片又は該塩基配列のうち 1 若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に 1 若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片(ただし、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列を有する核酸を除く)。

【請求項 2】 塩基数が 120 以下である請求項 1 記載の核酸断片。

【請求項 3】 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する請求項 2 記載の核酸断片。

【請求項 4】 請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の核酸断片が複数連結された核酸断片。

【請求項 5】 請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の核酸断片と、該核酸断片の下流に位置する構造遺伝子とを少なくとも含み、前記核酸断片により、該構造遺伝子の発現が促進される組換えベクター。

【請求項 6】 前記核酸断片は、前記構造遺伝子の上流に位置するイントロン配列中に挿入されている請求項 4 記載の組換えベクター。

【請求項 7】 前記イントロン配列は、配列表の配列番号 3 で示される塩基配列を有する請求項 6 記載の組換えベクター。

【請求項 8】 配列表の配列番号 2 に示される塩基配列を有する核酸を含む請求項 7 記載の組換えベクター。

【請求項 9】 構造遺伝子の上流に請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の核酸断片を挿入することから成る、構造遺伝子の発現促進方法。

【請求項 10】 前記核酸断片を、前記プロモーターの上流に位置するイントロン配列中に挿入する請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】 前記イントロン配列は、配列表の配列番号 3 に示す塩基配列を有する請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】 前記核酸断片を挿入することにより、該核酸断片が複数連結された領域が形成される請求項 11 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する機能を有する核酸断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた構造遺伝子の発現方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

外来遺伝子の発現促進は、遺伝子工学の手法を植物に応用する際に最も必要とされる技術である。その技術のひとつに遺伝子発現の促進効果を有する DNA 断片の利用がある。外来遺伝子の発現を促進する DNA 断片としては、トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼのイントロシ (Callis et al., Gene & Development 1, 1183-1200 (1987)) 及びイネのホスホリパーゼ D (以下、「PLD」ということがある) の第 1 イントロン (国際公開公報 W096/30510) 等が知られている。また、イントロン由来の DNA 断片について、イントロシの内部配列を一部削除したり、あるいはイントロシの内部に同一のイントロンを挿入して発現促進作用へ及ぼす影響を調べた事例が報告されている (Mascarenhas et al. Plant Mol. Biol. 15, 913-920 (1990), Clancy et al. Plant Sci. 98, 151-161 (1994))。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、現状では利用できる DNA 断片の種類が限られており、発現促進効果も不十分である場合が多いため、より効果の大きい DNA 断片の存在が望まれていた。また、上記のように、イントロン配列を修飾することにより発現促進効果を高める試みが行なわれているが、イントロン内部の発現促進作用を有する領域を特定した事例や、促進作用がもとのイントロン由来 DNA 断片の 2 倍に達した事例は知られていない。

【0004】

従って、本発明の目的は、下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果が

優れた新規な核酸断片、該核酸断片を含み、構造遺伝子の発現が促進された組換えベクター及び該核酸を用いてその下流の構造遺伝子の発現を促進する方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、イネのホスホリパーゼD(以下、「PLD」ということがある)の第1イントロン中の特定の領域が、優れた遺伝子発現促進効果を有することを見出し、本発明を完成した。

【0006】

すなわち、本発明は、配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する核酸断片又は該塩基配列のうち1若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に1若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片(ただし、配列表の配列番号3記載の塩基配列を有する核酸を除く)を提供する。また、本発明は、上記本発明の核酸断片と、該核酸断片の下流に位置する構造遺伝子とを少なくとも含み、前記核酸断片により、該構造遺伝子の発現が促進される組換えベクターを提供する。さらに、本発明は、構造遺伝子の上流に上記本発明の核酸断片を挿入することから成る、構造遺伝子の発現促進方法を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】

上記のように、本発明の核酸断片は、配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する核酸断片又は該塩基配列のうち1若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に1若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片である。ただし、配列表の配列番号3に示される塩基配列は、イネのPLDの第1イントロンの塩基配列であり、イネのPLDの第1イントロンがその下流の遺伝子の発現促進効果を有することは、既に本出願人が明らかにしている(国際公開公報W096/30510)ので、この配列は除外する。なお、配列番号1に示す塩基配列は、イネのPLDの第1イントロン(配列番号3)の5'末端から第2番目

の塩基（以下、「2nt」のように記載）から65ntの領域の塩基配列である。

【0008】

上記の通り、配列番号1に示す塩基配列のうち1若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に1若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片（以下、便宜的に「修飾核酸断片」ということがある）も本発明の範囲に含まれる。この場合、修飾核酸断片中の、配列番号1記載の配列に対応する部分は、配列番号1記載の配列と70%以上、さらに好ましくは85%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有していることが好ましい。また、これらの修飾核酸は、配列番号1で示される塩基配列を有する核酸と、ストリンジェントな条件（すなわち、5 x Denhardt's reagent, 6 x SSC, 0.5% SDS又は0.1% SDSといった一般的なハイブリダイゼーション溶液を用いて5.0～6.5℃で、好ましくは5.0℃と6.0℃の2段階、又は、5.0℃、5.5℃、6.0℃、6.5℃の4段階で反応を行なう）において、ハイブリダイズするものであることが好ましい。

【0009】

さらに、本発明の核酸を、発現を促進したい構造遺伝子上流に挿入する場合、遺伝子の発現促進に効果のある、できるだけ小さな領域を挿入することが好ましいので、本発明の核酸の塩基数は120塩基以下であることが好ましく、さらに好ましくは80塩基以下であり、さらに好ましくは64塩基以下である。

【0010】

上記本発明の核酸断片は、2個以上連結することによりその効果をより大きくすることが可能である。この場合、本発明の核酸断片を直接連結してもよいし、それらの間に他の配列が介在していてもよい。

【0011】

本発明の核酸はDNAでもRNAでもよいが、安定性の観点からDNAが好ましい。

【0012】

本発明の核酸断片は、化学合成により容易に調製することができる。また、イ

ネPLD遺伝子の第1イントロンの配列は既に公知であるので（国際公開公報W096/30510）、イネのゲノミックDNAを鋳型としたPCR等の核酸増幅法により容易に調製することができる。PCRはこの分野において周知であり、そのためのキット及び装置も市販されているので容易に実施することができる。

【0013】

なお、本発明の核酸断片を複数連結する場合には、複数の本発明の核酸断片を予め連結してもよいし、本発明の核酸断片を含む領域に本発明の核酸断片を挿入してもよい。

【0014】

構造遺伝子の上流に上記した本発明の核酸断片を挿入することにより、該構造遺伝子の発現を促進することができる。構造遺伝子は、その上流に位置するプロモーターにより制御されるが、本発明の核酸断片は、プロモーターと構造遺伝子の間に挿入してもよいし、プロモーターの上流に挿入してもよいが、前者がより好ましい。この場合、本発明の核酸断片と構造遺伝子の距離は0bp～1000bpが好ましく、また、プロモーターと本発明の核酸断片との距離も0bp～1000bpが好ましい。

【0015】

本発明の核酸断片は、発現を促進しようとする構造遺伝子の上流に位置するイントロン配列中に挿入することが好ましい。このようなイントロン配列は特に限定されないが、好ましい例としてイネのPLD遺伝子の第1イントロン（配列番号3）を挙げることができる。イントロン配列中に挿入する場合、本発明の核酸断片の挿入位置は特に限定されない。プライマーの一部がイントロン断片と共に挿入されていてもよい。もっとも、イントロンがイネのPLD遺伝子の第1イントロン（配列番号3）である場合には、本発明の核酸断片が複数連結されるように、イントロンの1又は65ntに挿入することが好ましく、特に65ntに挿入して本発明の核酸断片を2個直結することが好ましい。なお、発現を促進しようとする構造遺伝子の上流にイントロン配列が必ずしも存在するとは限らないが、適当なイントロン配列が存在しない場合には、先ず、発現を促進しようとする構造遺伝子の上流に例えばイネPLD遺伝子の第1イントロンのような適当なイン

トロン配列を挿入し、これに本発明の核酸断片を挿入することができる。なお、挿入は、制限酵素を用いた常法により容易に行うことができる。

【0016】

本発明はまた、上記本発明の方法を発現ベクターに適用して得られる組換えベクターを提供する。本発明の組換えベクターは、市販の発現ベクターのクローニング部位に本発明の核酸断片と、発現を促進すべき構造遺伝子とを挿入することにより容易に調製することができる。なお、このような発現ベクターは、種々のものがこの分野において周知であり、かつ市販されている。これらの発現ベクターは、宿主細胞内で複製するための複製開始点、プロモーター、外来遺伝子を挿入するための制限酵素部位を与えるクローニング部位及び薬剤耐性遺伝子等の選択マーカーを少なくとも含み、通常、転写を安定に終了させるターミネーターや、宿主が細菌の場合にはSD配列を含む。本発明の方法においては、これらの公知の発現ベクターのいずれをも採用することができる。

【0017】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0018】

35Sプロモーターの下流にbeta-Glucuronidase (GUS) 遺伝子を配したCLONTECH社製のベクターpBI221 (35S promoter, GUS) に、下記のように、分割したPLDイントロンの内部領域、PLDイントロン、さらに一部の領域を重複させたPLDイントロンを挿入してGUS発現の促進効果を調べた。

【0019】

ベクターを以下の方法で作製した。イネのPLD遺伝子の第1イントロンは173塩基からなる(配列番号3)。イントロンの2nt~65nt、66nt~120nt、121nt~173ntの領域に対応するDNA断片をPCRによって得た。用いたプライマーは、それぞれ

5'-CTATGACCCGGGATCCTAAGCCCAGTGTGC-3' と

5'-GCAAGCAAGCAGATCTGAGCGGAGAAGAAG-3'、

5'-TATGACCCGGGATCCGATCTGCTTGCTTGC-3' と

5'-ACCTAACGTAGATCTAGCGACACTCGCAGC-3'、

5'-TATGACCCGGGATCCGCTTCGTCTTCCTTC-3' と

5'-GTGTCGCTAGATCTCTGCGCCCCCCCCACAC-3'

である。PCR産物を制限酵素BamHIおよびBglIIIで消化して、pBI221のマルチクローニング部位にあるBamHIサイトに挿入した (pBI [PLD(2-65)]、pBI [PLD(66-120)]、およびpBI [PLD(121-173)]。

【0020】

さらに、次のように2nt～65ntあるいは66nt～120ntの領域を重複して含むPLDイントロンを有するベクターを作製した。先ず、W096/30510に記載されるように、イネPLD遺伝子の第1イントロン(配列番号3)をプライマー(5'-ACCCGGTAAGCCCAG-3'、3'-CCCCGCGTCCATCC-5')を用いてPCRにより増幅し、該増幅産物をpBI221ベクターのSmaI部位に挿入したpBI221ベクター (pBI [PLD]) を調製した。該イントロン配列をBglIIIによってイントロンの65番目の部位で切断し、BamHIおよびBglIIIで消化した上記のPCR産物を挿入した (pBI [PLD+PLD(2-65)] およびpBI [PLD+PLD(66-120)])。

【0021】

既報 (Shimamoto et al. Nature, 338,274-276 (1989)) の方法にしたがってイネ培養細胞 (Baba et al. Plant Cell Physiol. 27,463-471 (1986)) に上記組換えプラスミドを導入後、 β -glucuronidase (GUS)活性を測定した。活性の相対値を表1に示す。

【0022】

【表 1】

ベクター	相対GUS活性
pBI221	1.0
pBI [PLD]	14
pBI [PLD (2-65)]	4.9
pBI [PLD (66-120)]	2.5
pBI [PLD (121-173)]	1.7
pBI [PLD+PLD (2-65)]	28
pBI [PLD+PLD (66-120)]	14

【0023】

PLDイントロンの分割では、3つの領域とも対照（pBI221）に比べて高いGUS活性を示した。2nt～65ntの領域の効果が最も高く、次が66nt～120ntの領域であった。これら2つの領域をイントロン内に挿入した場合は、2nt～65ntの領域の重複で、活性がもとのイントロンの場合の2倍になった。しかし、66nt～120ntの領域の重複では活性の上昇は認められなかった。

【0024】

以上の結果から、PLDイントロンの2nt～65ntの領域は、遺伝子発現を促進する効果を有することが明らかになった。2nt～65ntの領域の塩基配列を配列番号1に、また2nt～65ntの領域を重複させたイントロン（両端にエキソン配列10塩基ずつを含む）の塩基配列を配列番号4に、両端のエキソン配列を除いたイントロン部分の配列を配列番号2に示す。

【0025】

【発明の効果】

上記のように、構造遺伝子上流に組み込むことにより、該構造遺伝子の発現が有意に促進される新規な核酸断片が提供された。本発明の核酸断片を構造遺伝子上流に挿入することにより、該構造遺伝子の発現が促進されるので、本発明は、例えば組換えベクターを用いた外来遺伝子の発現を促進することができ、遺

伝子工学の分野などにおいて多いに貢献するものと期待される。

【 0 0 2 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN TOBACCO INC.

<120> Nucleic acid fragments, recombinant vectors containing the same and method for promoting expression of structural genes using the same

<130> 98558

<160> 12

【 0 0 2 7 】

<210> 1

<211> 64

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

taagcccagt gtgcttaggc taagcgact agagcttctt gtcgcttgc tttcttccg 60
ctca 64

【 0 0 2 8 】

<210> 2

<211> 242

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 2

gtaagcccag tgtgcttagg ctaagcgac tagagcttct tgcgcttg cttcttcc 60
gctcagatcc taagcccagt gtgcttaggc taagcgact agagcttctt gtcgcttgc 120
ttcttctccg ctcagatctg cttgcttgct tgcttcgcta gaaccctaact ctgtgctgcg 180
agtgtcgctg cttcgcttc cttcctcaag ttcgatctga ttgtgtgtgt gggggggcgc 240
ag 242

【 0 0 2 9 】

<210> 3

<211> 173

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 3

gtaagcccag tgtgcttagg ctaagcgcac tagagcttct tgctcgcttg cttcttctcc 60
gctcagatct gcttgcttgc ttgcttcgct agaaccctac tctgtgctgc gagtgcgct 120
gcttcgtctt ccttcctcaa gttcgatctg attgtgtgtg tggggggcg cag 173

【0030】

<210> 4

<211> 262

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 4

tcaccaccg gtaagcccag tgtgcttagg ctaagcgcac tagagcttct tgctcgcttg 60
cttcttctcc gctcagatcc taagcccagt gtgcttaggc taagcgcact agagcttctt 120
gctcgcttgc ticttctccg ctcagatctg cttgcttgct tgcttcgcta gaaccctact 180
ctgtgctgcg agtgcgctg cttcgtcttc cttcctcaag ttcgatctga ttgtgtgtgt 240
ggggggcg aggtaggcg ag 262

【0031】

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 5

CTATGACCCG GGATCCTAAG CCCAGTGTGC 30

【0032】

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 6

gcaagcaagc agatctgagc ggagaagaag

30

【 0 0 3 3 】

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 7

tatgaccgga gatccgatct gcttgcttgc

30

【 0 0 3 4 】

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 8

acctaacgta gatctagcga cactcgcage+

30***

【 0 0 3 5 】

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 9

tatgaccgga gatccgcttc gtcttccttc

30

【 0 0 3 6 】

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 10

gtgtcgctag atctctgcgc cccccacac

30

【 0 0 3 7 】

<210> 11

<211> 15

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 11

acccggttag cccag

15

【 0 0 3 8 】

<210> 12

<211> 15

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 12

cccccgctc catcc

15

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果が優れた新規な核酸断片を提供すること。

【解決手段】 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する核酸断片又は該塩基配列のうち 1 若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に 1 若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片(ただし、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列を有する核酸を除く)を提供した。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000004569

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

【氏名又は名称】

日本たばこ産業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100088546

【住所又は居所】

東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル
6階 谷川国際特許事務所

【氏名又は名称】

谷川 英次郎

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000004569]

1. 変更年月日	1995年 5月16日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
氏 名	日本たばこ産業株式会社